

⑬ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57—206391

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和57年(1982)12月17日

C 12 P 1/00

6760—4B

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

④ 酵素処理によるフラボノイド系天然色素の製造法

⑫ 発明者 元田節士  
横浜市金沢区東朝比奈一丁目23番18号

⑪ 特 願 昭56—90222

⑪ 出 願 人 森永製菓株式会社  
東京都港区芝5丁目33番1号

⑫ 出 願 昭56(1981)6月12日

明 細 書

1. 発明の名称

酵素処理によるフラボノイド系天然色素の製造法

2. 特許請求の範囲

1 フラボン系化合物を含む植物組織または該植物組織の抽出液に、ポリフェノールオキシダーゼ (EC 1.14.18.1) を作用させることにより、その抽出液中の色素物質を生成増加せしめ、次いで該色素物質を取得することを特徴とする酵素処理によるフラボノイド系天然色素の製造法。

2 フラボン系化合物を含む植物組織が、ココア豆、ココア豆外皮、ビーナッツ薄皮、茶である特許請求の範囲第1項記載のフラボノイド系天然色素の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、フラボン系化合物を含む植物組織、たとえばココア豆、ココア豆外皮、ビーナッツ薄皮、茶などから、ポリフェノールオキシダーゼを作用させることにより色素物質を増加せしめ好収

率で天然色素を得ることを目的とする。

食品の色は、食生活において重要な役割を果たしており、また商品価値を決定する大切な要素である。従って、食品分野では多種類の色素が使用されタール系の合成着色料が用いられてきた。しかし、最近食品の安全性が重要視されタール系の合成着色料の毒性問題と関連して、天然着色料へ転換する傾向が強くなってきた。従って、比較的安価でかつ安定性のある天然着色料の開発が切望されている。このような観点から天然着色料の開発につき鋭意研究の結果、本発明を完成した。

ココア豆またはココア豆外皮からの天然色素は、フラボン系化合物に属するカテキン、アントシアニン、ロイコアントシアニンなどが複雑な酸化あるいは縮重合することによって生成する、主としてポリフェノールタイプの化合物であり、ココア豆またはココア豆外皮およびそれらの抽出液は、色素のもととなる未酸化のポリフェノール類を多量に含んでいる。従って、これらの未酸化のポリフェノール類を酸化重合させることにより色素物

質を生成させ、抽出液中の色素物質の濃度を増加させることができると考えられる。また、ピーナツ薄皮は、種子の2～4%を占め、ピーナツバター、ピーナツ蛋白などを製造する際の副産物である。ピーナツ薄皮は、少量のロイコアントシアニン、フラボン、フラバノンと共に3%のフロバフェンや7～15%のタンニンからなる色素を含んでいる。しかし、そのまゝでは色素物質が少なく、色素抽出の原料には適さない。そこで、ピーナツ薄皮中のフラボン系化合物を酸化重合させることにより色素物質を生成させ、色素抽出の原料に変換させることが可能であると考えられる。

ココア豆外皮からの天然色素の抽出採取法は古くから提案されており（特公昭8-3401号）、外皮をそのまゝ、または前処理として酸処理（特開昭53-109529号）や微生物処理（特開昭53-79068号）などを行う方法が、これまで提案されてきた。しかし、これらの方法は、色素物質を生成増加させる処理方法ではなく色素の抽出量

に限界があり、抽出後において抽出液中の色素物質の量を生成増加させることはできない。また、微生物処理を行う方法（特開昭53-79068号）は、培養日数が6～8日間と長期間を要するという欠点もあり工業的にきわめて不利益である。

本発明者は、これら植物組織に含まれるフラボン系化合物を酸化重合して色素物質を増加させ、高収率をもって有用な天然色素を有利に取得する方法について検討を行った。その結果、植物組織に含まれるフラボン系化合物に、ポリフェノールオキシダーゼ（EC 1.14.18.1）を作用させることにより色素物質をきわめて多量に増加させることができるという新知見を得て本発明を完成した。

本発明の方法によれば、フラボン系化合物を含む植物組織、たとえばココア豆外皮やピーナツ薄皮に直接酵素を作用させ色素物質を増加させた後、抽出することにより色素抽出液が得られる。しかし、植物組織の抽出液に酵素を作用させた方がより効果的である。該抽出液の調製は、アルカ

リ性条件下の水性媒体での加熱抽出がよい。これら抽出液は、酵素の作用に適したpHに調整される。使用する酵素としては、ポリフェノール類を酸化重合し得る酵素、たとえば市販のポリフェノールオキシダーゼ（チロシナーゼ）や微生物より得たポリフェノールオキシダーゼなどが利用できる。酵素処理時間は、酵素濃度により適宜に変更できるが5000単位/mlの酵素液を5%使用した場合10時間以内で十分である。ここでいう1単位とは基質として1mMのd-カテキンを用いて35℃で酵素を作用させ（pH 5.2）、生成する着色物質を反応液と同量のn-ブタノールで抽出し、n-ブタノール層の430nmにおける吸光度を1分間に0.001増加させる酵素量である。作用温度は酵素の作用し得る温度で30～40℃が好ましい。酵素処理抽出液は、水に相溶性の有機溶剤で多糖類や蛋白質の不純物を沈でん除去し、さらに高純度の色素製品を得るために色素液のpHを9～12に調整し色素物質を沈でんさせる。色素沈でん物を少量の水に溶解し水溶液のpHを6～

7に調整した後、濃厚色素液とするかまたは乾燥粉末化するのが望ましい。

表1および表2は、ココア豆外皮（20g）またはピーナツ薄皮（10g）に水400mlを加え、pH 10で1時間加熱抽出したフラボン系化合物含有抽出液に、pH 4.7でポリフェノールオキシダーゼを作用させたときの効果を示したものである。抽出操作は4回行った。酵素処理の結果、ココア豆外皮抽出液の場合には対照（無処理）に比べ、いずれの抽出液も色素濃度が約2倍に向上した。ピーナツ薄皮抽出液の場合は対照（無処理）に比べ、1回目の抽出液では約4倍に、2回目の抽出液では約1.5倍に色素濃度が向上した。

表1. 酵素処理によるココア豆外皮抽出液の褐変

抽出操作	445nmの吸光度		475nmの吸光度	
	対	照	対	照
1回目	1.44	2.48	1.26	2.34
2回目	0.96	1.78	0.86	1.71
3回目	0.46	0.80	0.42	0.77
4回目	0.24	0.37	0.20	0.35

表 2. 酵素処理によるピーナツ薄皮抽出液の褐変

抽出操作	445nmの吸光度		475nmの吸光度	
	対 照	酵素処理	対 照	酵素処理
1 回 目	1.38	5.06	1.20	4.72
2 回 目	1.76	2.80	1.68	2.58
3 回 目	0.57	0.40	0.57	0.34
4 回 目	0.20	0.10	0.19	0.09

いずれの抽出液の場合も第2回目までの抽出操作までに約80%の色素物質が抽出され、抽出操作は前後の工程や経済性から考えて2回の抽出操作が適当である。

以下実施例により本発明を詳述する。

#### 実施例 1

100gのピーナツ薄皮に4ℓの水を加え、苛性ソーダでpH10とした後95℃で1時間抽出し遠心分離により抽出液を分離後、残渣に3.5ℓの水を加えpHを10とした後95℃で1時間抽出した。抽出液を遠心分離により分離後、合併して7ℓの抽出液を得た。この抽出液のpHを4.7に塩酸で調整して5000単位/mlのクロシナーゼ

でpH6.5に調整して濃厚色素液を得た。この色素液を凍結乾燥し15gの色素粉末を得た。

#### 実施例 3

ピーナツ薄皮の代りに200gのココア豆外皮を使用し実施例1と同様の操作を行い濃厚色素液を得た。また同様に操作し濃厚色素液を凍結乾燥し33gの色素粉末を得た。

#### 実施例 4

ピーナツ薄皮の代りに200gのココア豆外皮を使用し実施例2と同様の操作を行い濃厚色素液を得た。また同様に操作し濃厚色素液を凍結乾燥し31gの色素粉末を得た。

#### 実施例 5

50gの市販緑茶に60mlの水を加えて湿潤させ50mlのクロシナーゼ(5000単位/ml、シグマ社製)を加えて35℃で12時間作用後1ℓの水を加えて加熱抽出し990mlの色素液を得た。この色素液を500mlに濃縮し1ℓのアセトンを加えて不純物を除去後、実施例1と同様の操作を行い濃厚色素液50mlを得た。

(EC1.14.18.1、シグマ社製)を5%添加し35℃で4時間作用させた。酵素処理後、減圧濃縮して2.5ℓとした後5ℓのアセトンを加えて多糖類や蛋白質などの不純物を析出させた後、濾過して得た濾液のpHを苛性ソーダで11に調整して色素物質を沈でんさせた。遠心分離により得た色素物質を100mlの水に溶解後、塩酸でpH6.5に調整して濃厚色素液を得た。この色素液を凍結乾燥し14.4gの色素粉末を得た。

#### 実施例 2

実施例1と同様にピーナツ薄皮抽出液を得、この抽出液のpHを4.7に塩酸で調整して、アルテルナリア・テヌイス(*Alternaria tenuis*) A-2菌(微工研菌寄第332号)の生産するポリフェノールオキシダーゼ(5000単位/ml)を5%添加し35℃で4時間作用させた。酵素処理後、減圧濃縮して2.5ℓとした後、5ℓのエタノールを加えて沈でんしてくる不純物を除去し、得られた色素液のpHを苛性ソーダで11に調整し、沈でんした色素物質を100mlの水に溶解後、塩酸

#### 実施例 6

実施例5のクロシナーゼの代りにアルテルナリア・テヌイスA-2菌(微工研菌寄第332号)の生産するポリフェノールオキシダーゼを使用し実施例5のアセトンの代りにエタノールを使用した以外は実施例5と同様の操作を行い濃厚色素液50mlを得た。

特許出願人 森永製菓株式会社